Prof. dr hab.n.med. i n. o zdr. Krzysztof Gutkowski
Katedra Chorób Wewnętrznych
Instytutu Nauk Medycznych
Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytetu Rzeszowskiego
Al. mjr. W. Kopisto 2A
35-959 Rzeszów

Rzeszów, dnia 13 maja 2023r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Beaty Kruk pt. *„Wpływ wybranych polimorfizmów genetycznych na progresję włóknienia w cholestatycznych chorobach wątroby"*.

Proces włóknienia jest swoistą odpowiedzią wątroby na działający przewlekle czynnik uszkadzający i wiąże się nierozłącznie z zapaleniem toczącym się w tkance wątrobowej. W historii naturalnej przewlekłych chorób wątroby wyróżnia się 4 stadia, które cechuje swoista aktywność procesów zapalenia i włóknienia. W stadium pierwszym dominuje zapalenie. W stadium drugim aktywność procesów zapalenia i włóknienia ulega zrównaniu, natomiast w stadium 3 włóknienie znacznie przewyższa aktywność zapalną. Końcowe stadium czwarte, tj. marskość, charakteryzuje minimalna aktywność obu procesów. Znamienny jest fakt, iż skład nacieku zapalnego w tkance wątrobowej jest różny i uzależniony od czynnika sprawczego. Mogą go tworzyć granulocyty, komórki Browicza-Kupffera, limfocyty, plazmocyty, a nawet płytki krwi. Aktywacja komórek wchodzących w skład nacieku skutkuje uwalnianiem dużej ilości prozapalnie działających cytokin i czynników wzrostowych. Molekuły te modyfikują skład i dynamiczny stan tzw. macierzy zewnątrzkomórkowej (*extracellular matrix, ECM*). Obszary wątroby dotknięte działaniem czynnika uszkadzającego zostają otoczone przez macierz zewnątrzkomórkową z wytworzeniem tkanki bliznowatej. Tkanka ta składa się z podobnych elementów niezależnie od rodzaju czynnika odpowiedzialnego za inicjację i propagację tego procesu. Aktualnie nie jest znany ściśle określony przedział czasowy, w którym zaawansowanie włóknienia warunkuje jego nieodwracalny charakter. Wiadomo także, że całkowita eliminacja czynnika uszkadzającego skojarzona z odpowiednim postępowaniem terapeutycznym może w przypadkach o nieznacznym zaawansowaniu doprowadzić do regresji włóknienia. Jednym z kluczowych zagadnień, które znajduje się w kręgu zainteresowania wielu ośrodków badawczych zajmujących się problematyką wółknienia, jest poszukiwanie i identyfikacja czynników mogących wpływać na modulowanie tego procesu. Dostępne dane z piśmiennictwa przemawiają za tezą, iż istotne znaczenie w progresji lub hamowaniu włóknienia wątroby

K. G.

mogą odgrywać polimorfizmy genetyczne. Dlatego też prowadzenie badań obejmujących ten obszar należy uznać za niezwykle cenne i w pełni uzasadnione.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa została zrealizowana pod kierownictwem naukowym Pani Prof. dr hab. n. med. Joanny Raszei-Wyszomirskiej zatrudnionej w Klinice Hepatologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Dysertacja liczy 76 stron i składa się z 6 rozdziałów poprzedzonych wykazem skrótów i streszczeniami w języku polskim i angielskim. Po rozdziale bibliografia zamieszczony jest wykaz 3 rycin, Opinia Komisji Bioetycznej oraz 15 oświadczeń współautorów publikacji. Rozprawa oparta jest o cykl trzech publikacji ogłoszonych drukiem w recenzowanych czasopismach medycznych, których treść jest zgodna z tematem zawartym w tytule rozprawy. Pierwsza z prac pt. „*PNPLA3 p.I148M and TM6SF2 p.E167K variants do not predispose to liver injury in cholestatic liver diseases: A prospective analysis of 178 patients with PSC*" została opublikowana na łamach PLoS One w 2018 roku. Druga pt. „*MARC1 p.A165T variant is associated with decreased markers of liver injury and enhanced antioxidant capacity in autoimmune hepatitis*" została opublikowana na łamach Scientific Reports w roku 2021, natomiast trzecia pt." *A common variant in the hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4 modulates liver injury in PBC but not in PSC: prospective analysis in 867 patients*" na łamach Orphanet Journal of Rare Diseases w roku 2022. Wszystkie prace były pracami oryginalnymi wysokoimpaktowymi o łącznej punktacji IF 12.075 i punktacji MEiN 280 punktów. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż w 2 publikacjach magister Beata Kruk była pierwszym autorem. Na przeprowadzenie badań Autorka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym.

W rozdziale pierwszym zatytułowanym *Wstęp uzasadniający połącznie publikacji w cykl,* Autorka wprowadza czytelnika w problematykę będącą przedmiotem dysertacji. Zwięźle charakteryzuje epidemiologię przewlekłych chorób wątroby i pryncypia procesu włóknienia tego narządu. Zwraca uwagę na ograniczone możliwości terapeutyczne u chorych z zaawansowanym włóknieniem i wynikającą z tego faktu dużą rolą badań, które pozwoliłyby na zdefiniowanie modulatorów tego procesu. W dalszej części rozdziału podkreśla znaczenie interakcji między predyspozycją genetyczną, a czynnikami środowiskowymi wpływającymi na postęp procesu włóknienia wątroby. Następnie charakteryzuje dwie cholestatyczne choroby wątroby tj. pierwotne zapalenie dróg żółciowych (PBC) i pierwotne stwardniające zapalenie dróg żółciowych (PSC), zwracając szczególną uwagę na różnicę w mechanizmach powodujących zastój żółci w obu jednostkach chorobowych. Podnosi także kluczowe znaczenie zaburzeń funkcji transporterów zlokalizowanych na błonie kanalikowej hepatocytów, które to zaburzenia mogą prowadzić do nieprawidłowości w wydzielaniu i składzie żółci, manifestujące się klinicznie, jako różne jednostki chorobowe przebiegające z cholestatycznym profilem uszkodzenia wątroby.

K.G.

W rozdziale drugim Autorka precyzuje założenia i cel pracy, które definiuje, jako:

1. Prospektywną analizę populacji pacjentów z PSC, PBC i autoimmunologicznym zapaleniem wątroby (AIH) oraz zespołami nakładania PSC-AIH i PBC-AIH w celu wykrycia polimorfizmów pojedynczego nukleotydu modulujących proces włóknienia wątroby.
2. Ocenę wpływu wybranych polimorfizmów genetycznych na postęp ww. jednostek chorobowych z uwzględnieniem procesu włóknienia.

Rozdział trzeci *Materiał i metody* zawiera charakterystykę badanej populacji i opisy metodologiczne wykonanych badań. Badania stanowiące podstawę rozprawy miały charakter prospektywny. Do projektu zostali włączeni pacjenci, którzy wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. Wybrane polimorfizmy, których potencjalny związek z modulowaniem procesu włóknienia wątroby poddano badaniu, genotypowano przy użyciu specjalnych sond typu TaqMan. Do pierwszego badania włączono 178 pacjentów z PSC w stadium marskości wątroby, natomiast do drugiego 313 z autoimmunologicznym zapaleniem wątroby i zespołami nakładania AIH-PSC, AIH-PBC. W badaniu trzecim wzięło udział 867 chorych z PBC i PSC oraz 468 zdrowych ochotników. Od każdego uczestnika badania pobrano próbkę krwi, która posłużyła do izolacji DNA przy wykorzystaniu zestawu Qiagen Extraction Kit produkcji niemieckiej. W dalszej kolejności w wyizolowanym DNA przeprowadzono genotypowanie wybranych wariantów polimorfizmów w oparciu o zastosowanie sond TaqMan. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programów statystycznych SPSS, GraphPad Prism. Rozkład analizowanych zmiennych oceniono przy pomocy testów Kołmogorowa-Smirnowa, natomiast pozostałe analizy statystyczne przeprowadzono przy pomocy testów niezależności chi-kwadrat, testu U Manna-Whitneya, Kruskala-Wallisa i testu ANOVA. Wyniki genotypowania analizowano przy użyciu testu chi-kwadrat i Armitage's trend test.

W rozdziale czwartym, Autorka prezentuje w sposób rzeczowy, syntetyczny i przejrzysty podsumowanie i wnioski z przeprowadzonych badań.

Rozdział piąty zawiera kopie 3 opublikowanych prac, a rozdział szósty 36 pozycji piśmiennictwa.

Reasumując, uważam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska magister Beaty Kruk pt.„ *Wpływ wybranych polimorfizmów genetycznych na progresję włóknienia w cholestatycznych chorobach wątroby"* poza wysokimi walorami poznawczymi, porusza ważne aspekty dotyczące praktycznego zastosowania genotypowania wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu , jako czynników modulujących postęp włóknienia wątroby. Dysertacja stanowi istotne uzupełnienie stanu wiedzy w obszarze możliwości diagnostycznych i prognostycznych u chorych z cholestatycznymi chorobami wątroby, a Autorka rozprawy wykazała się wnikliwością, rzetelnością, samodzielnością i dojrzałością naukową, jak również bardzo dobrą znajomością warsztatu

K.G.

badawczego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż Autorka rozprawy dokonała rekrutacji do badania bardzo dużej grupy chorych. Biorąc pod uwagę fakt, iż PBC, PSC, AIH jak również zespoły nakładania PSC/AIH oraz PBC/AIH należą do rzadkich chorób wątroby, włączenie do badania ponad 1350 chorych i blisko 500 zdrowych ochotników, tylko podkreśla wysoką wartość pracy i bardzo duże zaangażowanie Autorki. Biorąc pod uwagę powyższe, jak również fakt, iż rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm., zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto składam wniosek o wyróżnienie rozprawy.

Prof. dr hab.n.med. i n. o zdr. Krzysztof Gutkowski

Krzysztof Gutkowski

K.G.